

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 7 月 15 日 (15.07.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/058964 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 15/00
 (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/016496
 (22) 国際出願日: 2003 年 12 月 22 日 (22.12.2003)
 (25) 国際出願の言語: 日本語
 (26) 国際公開の言語: 日本語
 (30) 優先権データ:
 特願 2002-376555
 2002 年 12 月 26 日 (26.12.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県和光市 広沢 2 番 1 号 Saitama (JP). 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市 本町 4 丁目 1 番 8 号 Saitama (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 太田 邦史

(OHTA, Kunihiro) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県 和光市 広沢 2 番 1 号 独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP). 瀬尾 秀宗 (SEO, Hidetaka) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県 和光市 広沢 2 番 1 号 独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP). 柴田 武彦 (SHIBATA, Takehiko) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県 和光市 広沢 2 番 1 号 独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP).

(74) 代理人: 園田 吉隆, 外 (SONODA, Yoshitaka et al.); 〒163-0243 東京都 新宿区 西新宿 2 丁目 6 番 1 号 新宿住友ビル 4 3 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): CN, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

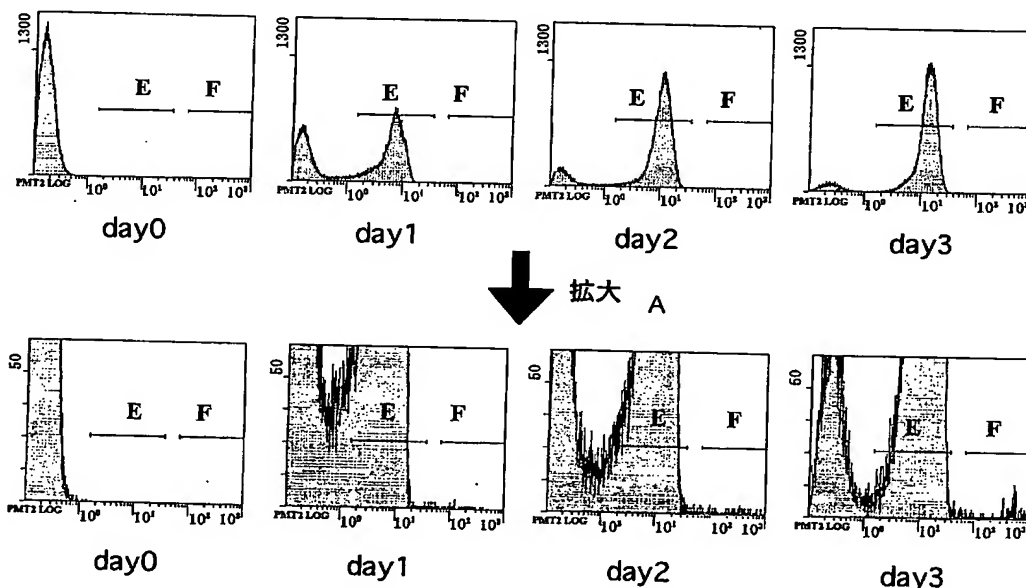
添付公開書類:

— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF INDUCING HOMOLOGOUS RECOMBINATION OF SOMATIC CELL

(54) 発明の名称: 体細胞相同組換えの誘発方法



A...ENLARGED

(57) Abstract: It is intended to provide a method of inducing homologous recombination of a somatic cell at the locus of the somatic cell to thereby obtain various novel genes. In an eucaryotic cell under homologous DNA recombination at an arbitrary locus, the transcriptional activity of a gene existing on the locus is regulated to thereby induce homologous recombination of the somatic cell between the above-described gene and another gene which is located upstream of a transcriptional promoter and has a DNA sequence similar to the above gene. Thus, various novel genes having plural genetic data can be obtained.

[続葉有]



2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約: 本発明は体細胞中の遺伝子座における体細胞相同組換えを誘発し、多様な新規遺伝子を取得する方法を提供する。任意の遺伝子座においてDNA相同組換えが起きている真核生物細胞中の該遺伝子座に存在する遺伝子の転写活性を制御することにより、該遺伝子と、転写プロモーターの上流域に存在する該遺伝子に類似するDNA配列を持つ遺伝子との間で体細胞相同組換えを誘発し、これによって、複数の遺伝情報を保持する多様な新規遺伝子の取得を可能にする。

明 細 書

体細胞相同組換えの誘発方法

技術分野

本発明は、一般には真核生物細胞における体細胞相同組換えを誘発する技術に係り、より詳細には体細胞中の任意の遺伝子座における体細胞相同組換えを誘発する方法及びかかる方法によって体細胞相同組換えが誘発される細胞に関する。

また、本発明は、前記の体細胞相同組換えの誘発方法を利用して複数の遺伝情報を保持する新規遺伝子を作製する方法並びにかかる方法によって作成された新規遺伝子にも関する。

さらに、本発明は上記新規遺伝子によってコードされる新規タンパク質にも関する。

またさらに、本発明は体細胞相同組換えを誘発するために使用して好適な構成を構築したベクターにも関する。

背景技術

真核生物にとって体細胞の相同組換えは、遺伝子の多様性を獲得し、その結果としてタンパク質の多様な活性を創出する上で最も重要な DNA 代謝反応の一つである。従って、体細胞の相同組換えを制御することは、多様な遺伝子を獲得する上で、非常に重要な課題の一つである。

従来、新しい機能・属性を有する多様な遺伝子を取得する手法として、DNA シャッフリングという技術が（例えば、Cramer 等, 1998 を参照）がある。この技術は、相同性のある複数の遺伝子配列を混合し、DNaseI で適当に消化して生じた小さな断片をプライマーとし、もともとの遺伝子を鋳型として PCR を行うことで、擬似的に相同組換えをおこさせるものである。しかしながら、組換え産

物の解析は、増幅された断片を発現ベクターにつなぎ、バクテリアにトランスフォームしたのちにおこなうのが一般的であり、産物が高等真核生物においてどのような性質をもつかを解析するのは直接的には困難であると思われる。また、動物細胞内での発現チェックは、新たなベクターへの移入とコドン利用率などに起因する発現適合性を逐次確認する必要がある。

一方、動物細胞内で遺伝子組換えを誘発する系としては、細胞内での組換えを活性化する系として、部位特異的組換え酵素 Cre-lox を用いた系（例えば、DiSanto 等, 1995 を参照）、配列特異的エンドヌクレアーゼ I-SceI を用いた系（例えば、Rouet 等, 1994 を参照。）などが存在する。Cre-lox の系はバクテリオファージ P1 から得られた 38kDa の部位特異的リコンビナーゼである Cre を用いて、loxP サイトと呼ばれる特定部位間で組換えを行わせるものである。また、I-SceI の系は、出芽酵母由来のエンドヌクレアーゼである I-SceI が、その認識サイトにおいて DNA 二重鎖を切断し、DNA 相同組換えを誘起する活性を利用したものである。しかしながら、これらの系では、組換えが特定配列間で限定して起きることと、組換え事象が単発であることなどから、得られる組換え体は原則的に一種類のみであった。また、組換えの制御に関わる配列をあらかじめ染色体に導入し、Cre あるいは I-SceI などの組換え酵素を細胞内で発現させる必要があり、染色体の組換えを誘導するのは容易ではなかった。

発明の開示

本発明者等は、上記事情に鑑みて、所望の体細胞相同組換えを制御された状況下で誘発させる方法がないかについて鋭意研究した結果、意外にも、組換えが望まれる遺伝子座における転写を制御することで、類似した塩基配列との間で体細胞相同組換えを誘発させることが可能になることを見出した。

よって、本発明は、一般には、体細胞中の遺伝子座における体細胞相同組換えを誘発する方法を提供することを目的とする。

また、本発明は上記方法によって体細胞相同組換えが誘発される細胞を提供することを目的とする。

さらに、本発明は、細胞において誘発された体細胞相同組換えを利用して複数の遺伝情報を保持する新規遺伝子及び該新規遺伝子を作製する方法を提供することを目的とする。

またさらに、本発明は該新規遺伝子によってコードされる新規タンパク質を提供することを目的とする。

また、本発明は体細胞相同組換えを誘発するために使用して好適な転写制御のための構成を構築したベクターを提供することを目的とする。

しかして、本発明においては、任意の遺伝子座においてDNA相同組換えが起きうる真核生物細胞の体細胞相同組換えを、該遺伝子座における遺伝子の転写制御を行うことによって、該遺伝子と類似する塩基配列との間でDNA相同組換えを誘発することを特徴とする体細胞相同組換えの誘発方法が提供される。また、かかる方法によって体細胞相同組換えが誘発された細胞も提供される。

また、本発明においては、任意の遺伝子座においてDNA相同組換えが起きうる真核生物細胞の体細胞相同組換えを、該遺伝子座における遺伝子の転写制御を行うことによって、該遺伝子と類似する塩基配列との間でDNA相同組換えを誘発して複数の遺伝情報を保持する新規遺伝子を取得する方法が提供される。また、かかる方法によって作成される新規遺伝子も提供される。

またさらに、該新規遺伝子によってコードされる新規タンパク質も提供される。

また、本発明は体細胞相同組換えを誘発するために使用して好適な転写制御に必要な構成を構築したベクターが提供される。

本発明の明細書中に開示された技術を用いれば、DNA相同組換

えが色々な箇所で継続的に行われるため、得られる組換え体の多様性を高めることが可能である。また、本発明の明細書中に開示された技術を用いれば、DNA シャッフリング技術において必要とされる組換え用の DNA ライブラリーを作製することなく、目的の細胞内で遺伝的多様性をもった目的遺伝子が自発的に形成されるため、所望の新規遺伝子の産生について該細胞内にてスクリーニングを行うことができる。従って、多様な新規遺伝子の取得を従来技術に比べて短縮された時間で達成することができる。

本発明において使用できる真核生物細胞としては、任意の遺伝子座において体細胞相同組換えが生じうる細胞であれば如何なるものでも使用可能であると思われるが、好適にはニワトリ由来の DT40 培養細胞が使用される。

体細胞相同組換えを誘発させる遺伝子は、内在性の遺伝子であっても、外来性の遺伝子であってもよい。また、該遺伝子と類似する塩基配列には、例えば、天然に存在する遺伝子配列、遺伝子としての形態を具備していない天然に存在する塩基配列、人為的な配列などが含まれる。

内在性の遺伝子の場合は、該遺伝子の転写活性を促進する転写プロモーターの上流近傍に該遺伝子と類似する配列が存在する遺伝子座に存在していれば利用可能であり、例えば、抗体軽鎖又は重鎖遺伝子座などが利用可能である。

また、外来性の遺伝子の場合は、相同組換えを引き起こす遺伝子の上流に転写プロモーターを含み、さらにその上流近傍に該遺伝子との類似配列を含むような構成で適当なベクター上に構築させ、対象の細胞の染色体上に組込ませるのであれば、如何なる遺伝子も利用可能である。

ここで、対象の遺伝子と類似する塩基配列は、対象の遺伝子の転写開始位置から 1 bps～100kbps 程度上流域に配置されればよく、より好ましくは 500bps～50kbps 程度、さらに好ましくは 3kbps

～25kbp 程度上流域に配置されるのがよい。

外来性の遺伝子として、限定はしないが、蛍光タンパク質遺伝子（例えば、GFP 遺伝子、CFP 遺伝子など）、薬剤耐性遺伝子（例えば、ハイグロマイシン耐性遺伝子、又はピューロマイシン耐性遺伝子）などが含まれる。

本発明において使用される、「体細胞相同組換えを誘発させる遺伝子と類似する塩基配列」とは、該遺伝子の全体もしくは一部と類似する塩基配列のことである。ここで、類似するとは、体細胞相同組換えを誘発させる遺伝子の全体もしくは一部と、60%以上の配列同一性、好ましくは70%以上の配列同一性、さらに好ましくは80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、を含む80%～99%の配列同一性を有することである。

本発明において使用される転写制御の方法は、当業者において周知の方法であれば使用可能であるが、内在性の転写プロモーターを利用することによる方法、又は外来性の誘導的な転写プロモーターを用いて制御する方法などが好ましい。また、転写活性を促進させるために、目的の遺伝子に適するエンハンサー、核マトリックス結合領域（MAR）を用いてもよい。転写制御を行うためには、転写を促進する対象遺伝子に対して、転写プロモーター、エンハンサー、核マトリックス結合領域（MAR）が作用可能に配置される必要がある。ここで、「作用可能に」とは、転写プロモーター、エンハンサー及び核マトリックス結合領域（MAR）がそれぞれの機能を発揮することができるようにとの意味であり、対象遺伝子が所望の状態に転写制御されることを意味する。例えば、転写プロモーターの場合は、特に限定はしないが、対象の遺伝子の転写開始位置より上流側100bp 以内程度の領域に配置され、エンハンサーの場合は、限定はしないが、通常、転写開始点から100bp 以上、あるいは数キロbp 以上離れて存在してもよく、対象遺伝子の5'側であっても、3'

側であってもよい。また、核マトリックス結合領域（MAR）はエンハンサーと隣接して配置され、エンハンサーの3'側でも5'側でもよい。

図面の簡単な説明

図1は、転写誘導に必要なシスに作用する領域をベクター上に構築する方法の概略を示す。

図2は、FACSによる蛍光強度の経時的変化について示す。ECFPと思われるゲートE、さらに蛍光強度の強い集団をゲートFとした。

図3は、FACSによる蛍光強度の経時的変化について示す。Eの蛍光強度とFの蛍光強度との比をとり、定量化した。

図4は、ECFP遺伝子とEGFP遺伝子との間で相同組換えを誘発させた細胞の蛍光顕微鏡による観察像を示す。ECFPの転写誘導5日後の蛍光顕微鏡像である。CFPの蛍光を発する細胞(A)の中に、GFPと思われる蛍光を発する細胞(B)が観測された(C)。

図5は、新規遺伝子配列の解析結果を示す。蛍光強度の強い細胞集団のTRE直下の配列を解析した結果、type1、type2、type3及びtype4の新規な四種類の組換え体が見出された。なお、4タイプの配列の上下にECFP及びEGFPの配列も示した。さらにECFP以外では、EGFPとECFPとで異なる配列のみ記した。

発明を実施するための最良の形態

強化青緑色蛍光タンパク質（ECFP）遺伝子の相同組換え方法は、本発明に係る体細胞相同組換えの誘発方法を一部に利用するものである。以下では強化青緑色蛍光タンパク質（ECFP）遺伝子の相同組換え方法について詳細に説明する。

前述のように、本発明の強化青緑色蛍光タンパク質（ECFP）遺伝子の相同組換え方法においては、DNA相同組換えが起きている

細胞を選択して培養し、相同組換えを誘発するにあたり、該細胞の DNA 相同組換えを誘導的なプロモーターによって調節し、ECFP と類似した塩基配列を持つ強化緑色蛍光タンパク質 (EGFP) 遺伝子配列との間で相同組換えを誘発させる。

よって、以下では、細胞の選択及び培養、誘導的転写制御のためのベクターの構築、相同組換えが誘発された新規遺伝子の発現確認、相同組換えが誘発された新規遺伝子配列の確認について順に説明する。

1. 体細胞相同組換えを誘発させる細胞の選択

本発明における「真核生物細胞」とは、体細胞相同組換えがある程度の頻度で生じているものを指し、好ましくは、ヒト、マウス、ヒツジ、ラット、ウサギ、ニワトリなどの B 細胞又はその細胞株、より好ましくはヒトバーキットリンパ腫由来のラモス細胞 (Ramos cell) 株、又はニワトリ B 細胞由来の DT40 細胞株であり、最も好ましくは DT40 細胞株である。

本発明において用いられる「DT40 細胞株」は、当該細胞の保有する染色体に何らかの修飾 (例えば、特定の遺伝子の組換え、挿入、削除等) が加えられた、誘導体株、サブライン (Subline) などを含む。

本発明で用いる細胞の培養条件は当該技術分野において周知の方法によって行われるが、選択される細胞に適した培地、培養条件 (培養温度、CO₂ 濃度) 下で行われることは言うまでもない。培地としては、一般に使用されている RPMI1640 培地、DMEM 培地又はこれらの培地にウシ胎児血清等を添加した培地等が挙げられる。培養は、通常、5 % CO₂ 存在下、用いる細胞にとっての適温 (例えば、25℃～40℃) で 1～30 日行う。培養中は必要に応じてカナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。また、転写制御を誘導的なプロモーターを用いて行う場合は、転写を誘導するための薬剤 (例えば、テトラサイクリンなど) を添加し

てもよい。しかして、選択される免疫細胞が DT40 細胞である場合、例えば、培地は IMDM (Invitrogen 社) を用い、培養温度は例えば 39.5℃、5%のCO₂濃度条件下で行う。

2. 転写制御のためのベクターの構築

(1) シスに作用する領域

本発明で用いられる転写制御の方法は、当業者にとって周知の技術であれば、如何なる方法を用いてもよいが、好ましくは、転写制御においてシスに作用する領域を適当なベクターに構築し、該ベクターを細胞内へ導入することで、染色体上の特定の遺伝子座に組込ませる方法が用いられる。ここで、「シスに作用する領域」とは、特定の遺伝子の転写制御に必要な DNA 配列であって、該遺伝子に隣接して存在する領域のことを指す。「シスに作用する領域」には、転写プロモーター、エンハンサー、核マトリックス結合領域 (MAR)、その他転写活性を制御するのに必要な任意の配列が含まれる。

転写プロモーターは、構成的プロモーター又は誘導的プロモーターのいずれも使用可能であるが、転写制御が容易であることから、誘導的プロモーターが好ましい。誘導的プロモーターとしては、 α -インターフェロン、ヒートショック、重金属イオン、及びグルココルチコイドなどのステロイド (Kaufman, 1990) 及びテトラサイクリンに応答するものが含まれる。他の望ましい誘導可能なプロモーターとしては、プロモーターの活性化因子が外から添加された場合に、細胞内で応答するものが含まれる。好適には、例えば、テトラサイクリン誘導プロモーターなどが使用可能である。

エンハンサー及び核マトリックス結合領域 (MAR) は選択された細胞中での転写活性の制御に機能するものであれば、如何なるものも使用可能であるが、DT40 細胞を用いる場合には、ニワトリ抗体軽鎖遺伝子エンハンサー (3' enhancer)、ニワトリ由来の核マトリックス結合領域を用いるのが好ましい。

シスに作用する領域の構成成分のうち、誘導的プロモーター、エ

ンハンサー及び核マトリックス結合領域 (MAR) は、配列が公知である場合には、その配列に基づいて PCR 法等により該配列を増幅するためのプライマーを作製し、適当な cDNA ライブラリー又はゲノムライブラリーから直接取得することも可能である。ここで用いるプライマーは、クローニングの便宜上、クローン化するためのベクター上に存在する制限酵素サイトを付加させるように設計するのが望ましい。取得されたエンハンサー及び核マトリックス結合領域 (MAR) は相同組換えを誘発させる遺伝子及び該遺伝子と類似した DNA 配列が構築されているベクター上、該遺伝子と類似した DNA 配列の間にプロモーター、該遺伝子の下流、3' 方向に向かって、核マトリックス結合領域 (MAR)、エンハンサーの順番あるいはその逆の順番で、適切に付加された制限酵素サイトを用いてクローニングすることができる。

また、誘導的プロモーターが予めクローニングされた市販のベクター、例えば、pTRE2hyg (Clontech 社) などに、目的の遺伝子、該遺伝子と類似の塩基配列、エンハンサー、核マトリックス結合領域 (MAR) 等をクローニングしてもよい。

(2) 遺伝子 (ECFP) の取得

相同組換えを誘発させる遺伝子は、内在性の遺伝子であってもよいが、単離された外来性の遺伝子でもよい。転写制御が容易であることから、外来性の遺伝子が好ましい。

相同組換えを誘発させる遺伝子は、当業者において周知の方法によりクローニングされるが、該遺伝子が存在する cDNA ライブラリー又はゲノム DNA に対し、該遺伝子を増幅するのに使用可能なプライマーセット (例えば、該遺伝子の 5' 端側及び 3' 端側に該遺伝子を増幅可能に設計した 1 対のプライマーセット) を用いて、正確性の高い DNA ポリメラーゼ (例えば、Pyrobest DNA Polymerase (TaKaRa)) により該遺伝子を増幅してもよい。

得られた遺伝子は、適当なクローニング用のベクター (例えば、

pBlueScriptII、pUC19 など) にクローニングすることができる。

相同組換えを誘発させる遺伝子が ECFP 遺伝子の場合は、市販のベクター (pECFP-C1) からクローニングを行ってもよい。

同様な方法により、ECFP 遺伝子の全体又は一部と類似する塩基配列を得ることが可能である。ECFP 遺伝子と類似する配列であれば、如何なる配列でも利用可能であるが、例えば、EGFP 遺伝子配列などが好ましい。

取得された ECFP 遺伝子及び ECFP 遺伝子と類似する配列は、前述したように、転写プロモーターを間に挟んで、ECFP 遺伝子の上流側 (即ち、5'側) になるように、「シスに作用する領域」を構築したベクター上に作用可能に挿入する。類似する DNA 配列の挿入する方向は、順方向でも逆方向でもよい。「順方向」とは、対象の DNA 配列が天然に存在するものであれば、天然に存在する方向のことであり、人為的な配列の場合は、任意の方向を「順方向」と決めてもよい。

3. 転写因子発現ベクターの構築

遺伝子の体細胞相同組換えを誘発するためには、転写プロモーターの活性を促進又は抑制するのに必要な転写因子の発現が必要である。例えば、テトラサイクリン誘導プロモーターの場合は、テトラサイクリン応答配列に結合して転写を調節する転写因子 (例えば、Tet リプレッサーと VP16 転写活性化ドメインを融合したもの) が必要である。これら転写因子を発現させるためのベクターは、例えば、該転写因子の発現に対して作用可能に連結されたプロモーター (例えば、ヒトサイトメガロウィルス最初期プロモーターなど)、適当な選択マーカー (例えば、ネオマイシン耐性マーカー、ハイグロマイシン耐性マーカーなど) などを含んでもよい。

また、プロモーターを制御するためのベクターは、市販のもの、例えば、pTet-Off 又は pTet-On ベクター (Clontech 社) などを用いてもよい。

4. 相同組換えが誘発された新規遺伝子の発現確認

(1) 選択した遺伝子の相同組換えの誘発

選択した遺伝子（ここでは ECFP 遺伝子）の相同組換えを誘発させるためには、ECFP 遺伝子に作用可能に連結されたプロモーターに対する転写因子の活性を、さらに調節する因子が必要である。該因子は選択された転写プロモーターに依存して決定され、当業者であれば過度の実験等を行うことなく選択することができる。例えば、選択されたプロモーターがテトラサイクリン誘導プロモーターである場合、該因子として、テトラサイクリン又はドキシサイクリンなどが利用可能である。

また、転写制御のためのベクター及び転写因子発現ベクターを選択された細胞に導入する必要がある。ベクターを細胞に導入する方法としては、当業者に周知の方法を用いることができるが、例えば、リン酸カルシウム法（Chen 及び Okayama, 1988）、カチオン性脂質による方法（Elroy-Stein 及び Moss, 1990）、エレクトロポレーション法（Neumann 等, 1982）等が利用可能である。

前記 2 種類のベクターを細胞に導入したのち、転写プロモーターの活性化に必要な因子（例えば、テトラサイクリン、ドキシサイクリンなど）を培地に添加又は除去することで目的の転写プロモーターを活性化させる。これにより、選択した遺伝子の相同組換えが誘発される。

(2) 相同組換えが誘発された新規遺伝子の発現確認

相同組換えが誘発されることにより生じる新規遺伝子の発現は、組換えが誘発される前の遺伝子産物の特性に応じて、当業者により周知の技術を用いて確認することができる。例えば、選択された遺伝子が特定の薬剤耐性を示すものである場合には、相同組換え誘発前の細胞と誘発後の細胞における特定の薬剤に対する許容濃度等を比較することで、新規遺伝子の発現を予測することができる。また、ECFP 遺伝子の場合には、発する蛍光波長の変化等で、新規遺伝子

の発現を確認することができる。

5. 相同組換えが誘発された新規遺伝子の配列解析

新規遺伝子が創出されたことは、相同組換えが行われた新規遺伝子の配列解析を行い、実際に相同組換えが起こったことによりさらに確認することができる。

相同組換えに関し確認を行う細胞のゲノム DNA を既知の方法により抽出し、確認すべき遺伝子の増幅に使用可能な特異的な DNA プライマー（例えば、目的の遺伝子領域全体を含むように、該遺伝子の 5' 側近傍に正方向のプライマーを設計し、該遺伝子の 3' 側に逆方向のプライマーを設計する）を用いて PCR 法により目的の遺伝子を増幅させる。

増幅に使用される DNA ポリメラーゼは市販のものを用いることができるが、正確性の高いものを使用することが望ましい。増幅を行うための条件は、使用する DNA プライマーのアニール温度、使用する DNA ポリメラーゼの性質等に依存するが、例えば、98℃ 2 分間の反応後、98℃ 30 秒、58℃ 30 秒、72℃ 1 分を 26 サイクル、さらに 72℃ で 5 分間反応させる。反応後の増幅産物は、アガロースゲル電気泳動で分離し、目的の遺伝子を含む DNA のバンドを切り出し、DNA を回収後、配列決定用のベクターへ組込む。配列決定用のベクターは当該技術分野で用いられる如何なるベクターであってもよいが、例えば、pCR2.1-TOPO (Invitrogen 社) などが用いられる。上記調製された配列決定用のベクター中の遺伝子の DNA 配列を、定法に従い決定することができる。

以下に実施例を示すが、本発明はこれに限定されるものではない。

実施例 1：誘導的転写制御のためのベクターの構築

遺伝子の発現を誘導的に制御するためのプロモーターを細胞内に導入するために、転写誘導に必要なシスに作用する領域をベクター

上に構築した（図 1）。

テトラサイクリン誘導プロモーター（TRE 及びヒトサイトメガロウィルスミニプロモーター）の下流に ECFP 遺伝子をつなぎ、さらに下流に MAR、エンハンサー（3' enhancer）をつないだ。上流には、約 3kb のスペーサー配列（酵母 Arg4 遺伝子、3kb の PstI 断片）を配置し、さらに ECFP とは逆向きに EGFP をつないだ。

MAR 及び 3' enhancer のクローニングは、PCR 法を利用した。PCR は、Roche 社製、Expand High Fidelity PCR system を使い、DT40 ゲノム DNA を鋳型とし、以下のようにデザインしたプライマーにより行った。

MAR :

正方向プライマー

5'-GCTGCAGTGTCCTTGGGGGTGAAATTCAG-3'（配列番号：1）

逆方向プライマー

5'-GCTCTAGAACTGCCCCCATTA AAAA ACTTTC-3'（配列番号：2）

3' enhancer:

正方向プライマー

5'-GCTCTAGAAGGCACAGCGCTGTCAGGGGTGC-3'（配列番号：3）

逆方向プライマー

5'-CCGCGGCCGCGTG GTGGGAGCGGGCAGGGG-3'（配列番号：4）

PCR 産物は、一度 pCR2.1 ベクターに TA クローニングし、その後適切な制限酵素で消化（MAR : PstI, XbaI, 3' enhancer : XbaI, NotI）した後、pBluescriptII にクローニングし直した。テトラサイクリン誘導プロモーターは、pTRE2hyg（Clontech 社）の、TRE を含む XhoI, EcoRI 断片を pBlueScriptII にクローニングし

た (pHS305)。この、TREを含むプラスミドに、ECFP 遺伝子を挿入した。ECFP 遺伝子は、pECFP-C1 プラスミド (Clontech 社) の ECFP を含む *NheI*, *MulI* 断片を、*EcoRI* 消化した pHS305 にブラントエンドライゲーションした (pHS344)。さらに、pBlueScriptII にクローニングしてある MAR を pHS344 の ECFP の下流部分に挿入した (pHS345)。前述のように、スペーサー配列には酵母 ARG4 遺伝子を用いた。これは、*PstI* により生じる 3kb 断片を pUC119 つないだものであるが、このプラスミドの *SnaBI* 断片に、EGFP 断片 (pEGFP-C1 の *NheI*, *BspEI* 断片) をブラントエンドライゲーションした。ここから、*PstI* により EGFP, ARG4 遺伝子を含む配列を切り出し、pHS345 の *XhoI* 断片にブラントエンドライゲーションすることで、pHS346 を得た。さらに、pBlueScriptII にクローニングしてある 3'enhancer を *XbaI* および *NotI* で消化した pHS346 に挿入して pHS347 とした。

実施例 2 : DNA 相同組換えが誘発される細胞の調製

(1) 細胞培養

DT40 細胞は、CO₂ 恒温槽にて 5%CO₂、39.5℃で培養した。培地は、IMDM 培地 (Invitrogen 社) を用い、10%FBS、1%ニワトリ血清、ペニシリン 100 単位/ml、ストレプトマイシン 100μg/ml、2-メルカプトエタノール 55μM を加えて使用した。

(2) トランスフェクション

テトラサイクリン誘導転写因子を発現する発現ベクター pTA-Hyg (Clontech 社) 30μg を *HindIII* で、また、60μg の pHS347 を *XmnI* で直線化し、既知の手法 (Buerstedde, 等, 1991) に従って DT40 細胞に感染させた。その際、2.5mg/ml ハイグロマイシン、100ng/ml ドキシサイクリンを培地に加えてセレクションを行った。その結果、ハイグロマイシン耐性クローンのうち、ドキシサイクリン非存在下で ECFP を発現するクローンを得ることができた (HS1

01株)。

実施例 3：新規遺伝子産物の確認

HS101 をドキシサイクリン非存在下で培養し、蛍光強度を EPICS ELITE ESP (ベックマン-コールター社)にて測定した結果、ECFP と思われる蛍光を発する集団が観測された (図 2 : ゲート E)。培養を続けると、ECFP よりもさらに蛍光強度の強い集団が観測された (図 2 : ゲート F)。E と F の比をとったところ、誘導開始からの培養時間に依存して F の存在比が上昇することが観測された (図 3)。さらに、誘導後培養 5 日目の細胞を蛍光顕微鏡で観察すると、ECFP の蛍光を発する細胞の中に、GFP と思われる蛍光を発するものが観測された (図 4)。

実施例 4：新規遺伝子配列の解析

(1) ゲノム DNA の抽出

FACS においてゲート F 近くの細胞をソートし、EPICS ELITE ESP (ベックマン-コールター社)により生細胞 5000 個をシリコンコートした 1.5ml チューブに集めた。シース液に懸濁された細胞を遠心 (1000g, 10min) により回収し、ペレットに直接 100 μ l のゲノム抽出バッファー (100 mM Tris-HCl(pH8.0), 5mM EDTA, 0.2% SDS, 200 mM NaCl 及び 100 μ g/ml プロテイナーゼ K) を加え、50℃で一晩消化した。翌日、250 μ l のエタノールを加え、穏やかに上下し反転させて混ぜた。ゲノムを遠心 (1000 g, 10 min) により回収し、70%エタノールで洗い、風乾した。ここに 100 μ l の TE(10 mM Tris-HCl(pH8.0), 1 mM EDTA) を加え、50℃で 30 分放置した後、4℃にて一晩かけて溶解させた。

(2) TRE 直下の配列の解析

抽出したゲノムから、PCR (Perkin Elmer 9600) でテトラサイクリン誘導プロモーターの直下の配列を増幅したものを TA クロ

ーニングして配列を解析した。

ゲノム DNA 溶液 5 μ l (細胞 5000 個に相当) を鋳型とし、プライマーは上流 (5'-CCATAGAAGACACCGGGACCGATCC-3') (配列番号: 5)、下流 (5'-TGCACGCTGCCGTCCTCGATGTTG-3') (配列番号: 6) それぞれ 10 pmol を使用した。Pyrobest DNA Polymerase (TaKaRa) を用いて、50 μ l スケールで反応させた。反応条件は、98 $^{\circ}$ C 2 分の後、98 $^{\circ}$ C 30 秒、58 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 1 分を 26 サイクル行い、最後に 72 $^{\circ}$ C 5 分間反応させた。その後、Ex Taq DNA Polymerase (TaKaRa) を 1 μ l 加え、72 $^{\circ}$ C 15 分反応させた後、全反応液の 20 μ l 分をアガロースゲル電気泳動で分離した。軽鎖遺伝子可変領域に相当するバンドを切り出し、Gel Extraction kit (Qiagen 社) により DNA を回収後、TOPO TA Cloning kit (Invitrogen 社) にて pCR2.1-TOPO ベクターに組込み、大腸菌にトランスフォーメーションした。プラスミドを抽出し、ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer 社) により配列を解析した。その結果、図 5 に示すように、ECFP と EGFP のキメラが生じていることが明らかとなった。四種類のキメラのうち、type1 は 36 クローン、type2 は 1 クローン、type3 は 4 クローン、type4 は 1 クローン、それぞれ得られた。また、ソーティングの際のコンタミネーションと思われる ECFP も 18 クローン得られた。

産業上の利用可能性

本発明ではライブラリー作製を経ずに、自発的に遺伝的多様性を持った目的遺伝子が形成され、その後すぐに動物細胞内でのスクリーニングが可能になるので、目的遺伝子の取得までの時間を大幅に短縮することが可能となる。

また、本発明では、様々な箇所において、継続的に相同組換えが誘発されるため、得られる組換え体の多様性を上昇させることも原理的に可能であり、新規な活性及び機能を持つ遺伝子を創出する技術

としても利用可能である。

参考文献

- Buerstedde, J.M. 及び Takeda, S. 1991. Cell 67:179-88
- Chen, C. 及び Okayama, H. 1988. BioTechniques 6:632-638.
- Cramer 等, 1998. Nature 391:288-291
- DiSanto 等, 1995. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:377-381
- Elroy-Stein, O. 及び B. Moss. 1990. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87:6743-6747.
- Kaufman, R.J. 1990. Methods Enzymol. 185:487-511.
- Neumann, E., M. 等, 1982. EMBO J. 1:841-845.
- Rouet 等, 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:6064-6068

請求の範囲

1. 任意の遺伝子座において DNA 相同組換えが起きている真核生物細胞の体細胞相同組換えを誘発する方法であって、該遺伝子座の遺伝子の転写制御を行うことによって、該遺伝子の塩基配列と該遺伝子と類似する塩基配列との間で DNA 相同組換えを誘発することを特徴とする体細胞相同組換えの誘発方法。
2. 前記細胞が DT40 細胞であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。
3. 前記転写制御のための転写プロモーターが、前記遺伝子と類似する塩基配列の下流 3' 側に配置され、前記遺伝子と作用可能に隣接することによって、該遺伝子の転写を制御することを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の方法。
4. 前記転写制御のためのシスに作用する領域が、エンハンサー、核マトリックス結合領域 (MAR) のいずれか一つ又は両方を含むことを特徴とする請求項 1 ないし 3 のいずれか一項に記載の方法。
5. 前記遺伝子及び前記遺伝子と類似する塩基配列が外来性である場合、
 - (a) 該遺伝子に類似する塩基配列、転写プロモーター及び該遺伝子のベクター上における順番が、5' 側から該遺伝子と類似する塩基配列、転写プロモーター、該遺伝子の順番であって、該転写プロモーターが該遺伝子と作用可能となるように挿入する段階、
 - (b) 該ベクターを細胞内へ導入して、該遺伝子に類似する塩基配列、転写プロモーター及び該遺伝子を染色体上に組込む段階、

を含むことを特徴とする請求項 1 ないし 4 のいずれか一項に記載の方法。

6. 前記ベクター上にエンハンサー、核マトリックス結合領域 (MAR) のいずれか一つ又は両方を前記転写プロモーターに対して作用可能に挿入することを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

7. 前記転写プロモーターが誘導的プロモーターであることを特徴とする請求項 5 又は 6 に記載の方法。

8. 前記誘導的プロモーターがテトラサイクリン誘導プロモーターであることを特徴とする請求項 7 に記載の方法。

9. 前記遺伝子が強化青緑色蛍光タンパク質 (EGFP) 遺伝子であることを特徴とする請求項 5 ないし 8 のいずれか一項に記載の方法。

10. 前記遺伝子と類似する塩基配列が強化緑色蛍光タンパク質 (EGFP) 遺伝子配列であることを特徴とする請求項 5 ないし 9 のいずれか一項に記載の方法。

11. 前記エンハンサーがニワトリ抗体軽鎖遺伝子エンハンサー (3' enhancer) であって、前記核マトリックス結合領域 (MAR) がニワトリ由来であることを特徴とする請求項 4 ないし 10 のいずれか一項に記載の方法。

12. 請求項 1 ないし 11 のいずれか一項に記載の方法により、DNA 相同組換えが誘発される細胞。

13. 請求項1ないし11のいずれか一項に記載の方法により、相同組換えが誘発される遺伝子。

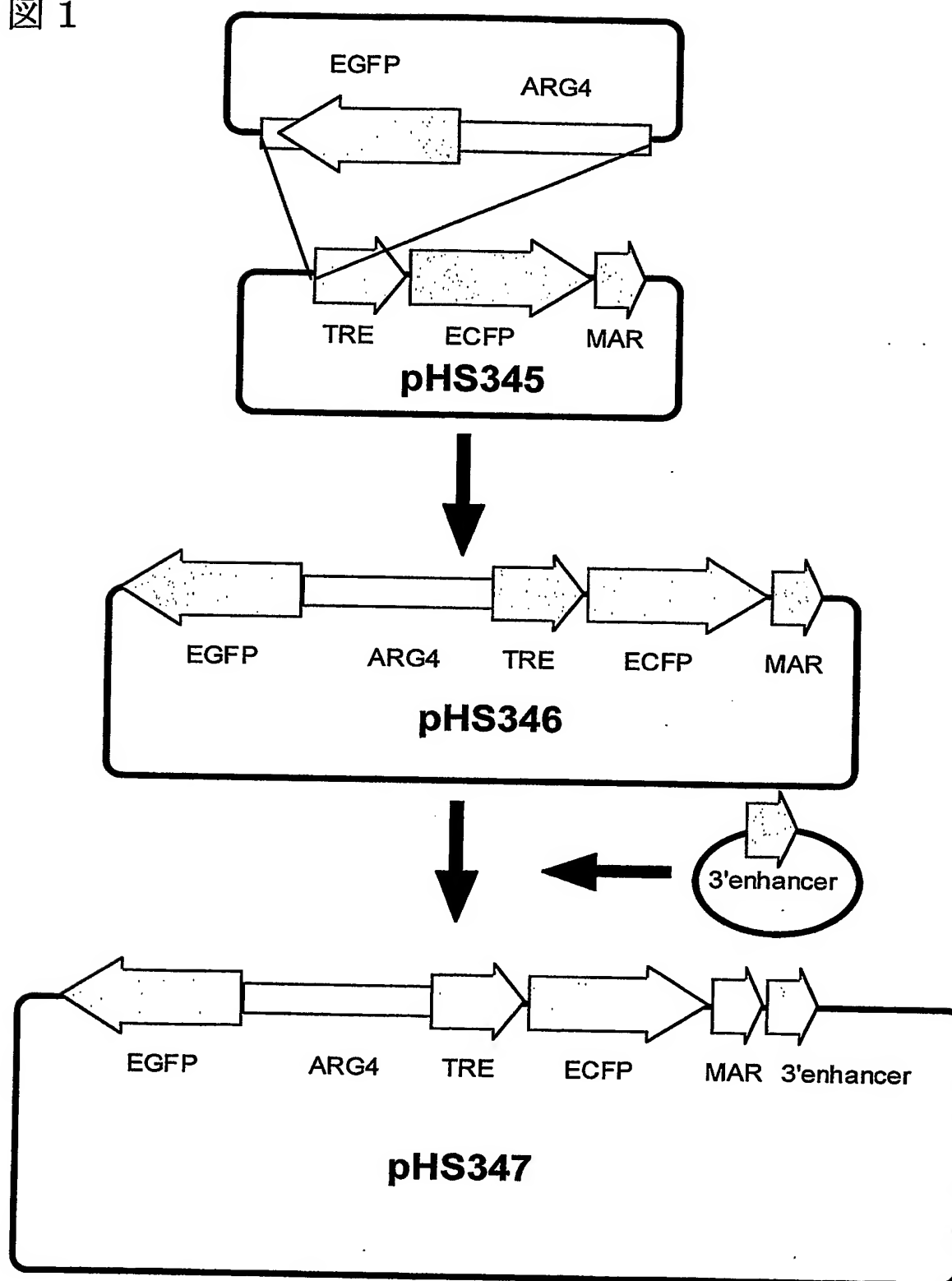
14. 請求項13に記載の相同組換えが誘発される遺伝子によってコードされるタンパク質。

15. 相同組換えを誘発する遺伝子及び該遺伝子の転写制御のための転写プロモーターが配置されたベクターにおいて、該転写プロモーターの5'側上流域に該遺伝子に類似する塩基配列が配置され、該遺伝子の相同組換えを誘発するために構築されるベクター。

16. エンハンサー、核マトリックス結合領域（MAR）のいずれか一つまたは両方をさらに作用可能に挿入した請求項15に記載のベクター。

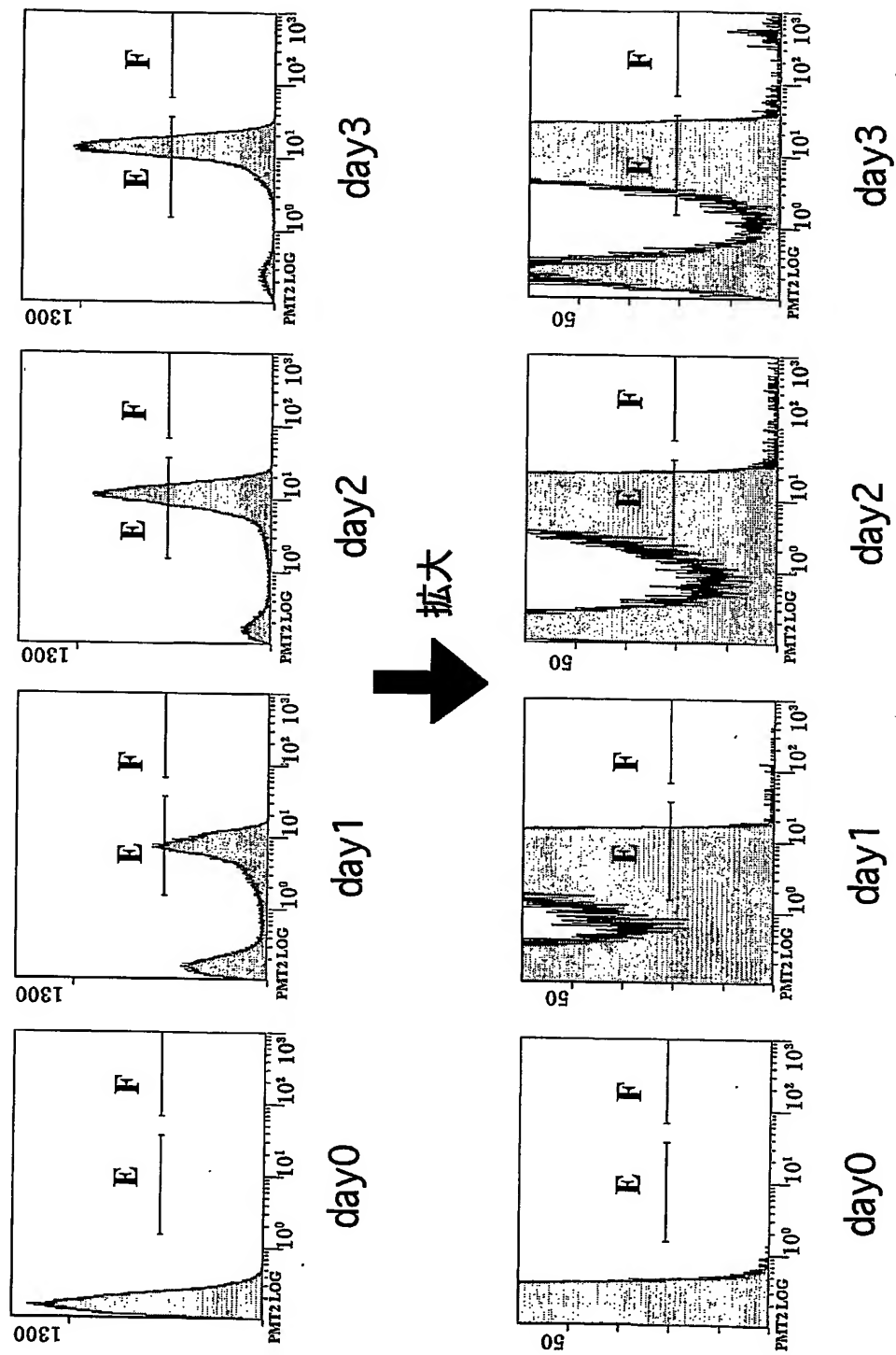
1/5

図 1



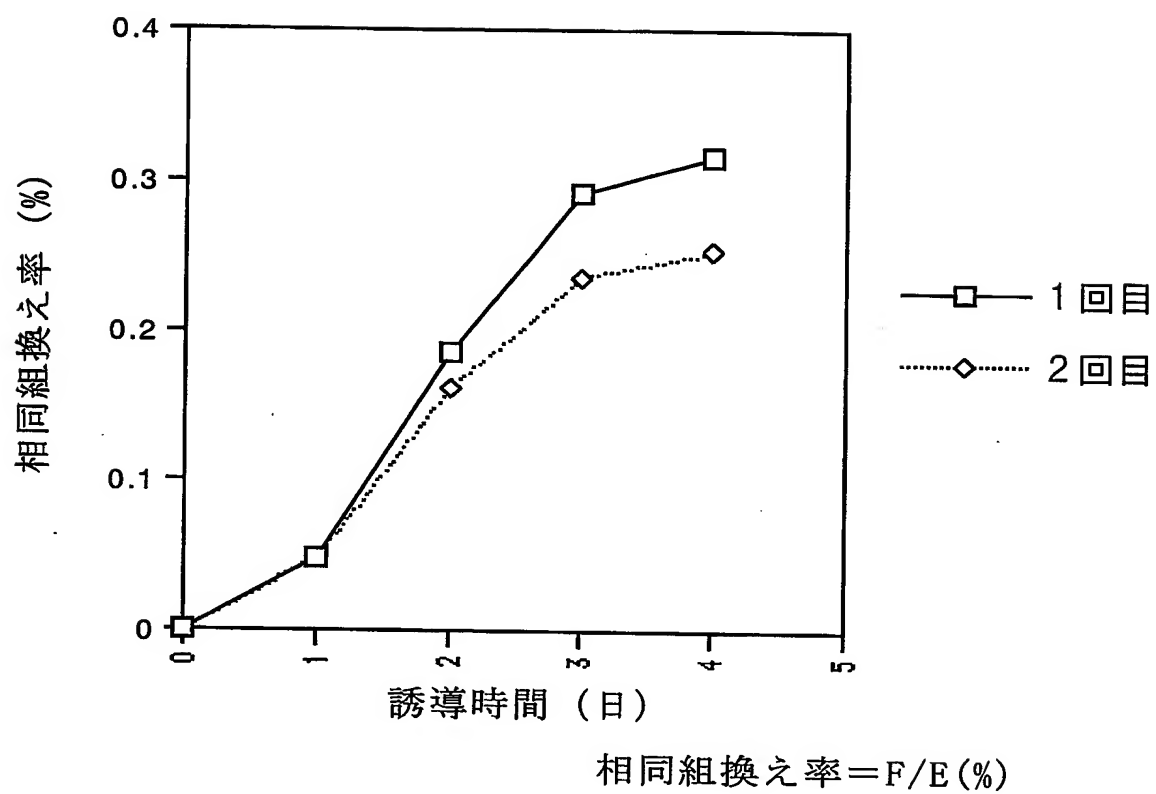
2/5

図 2



3/5

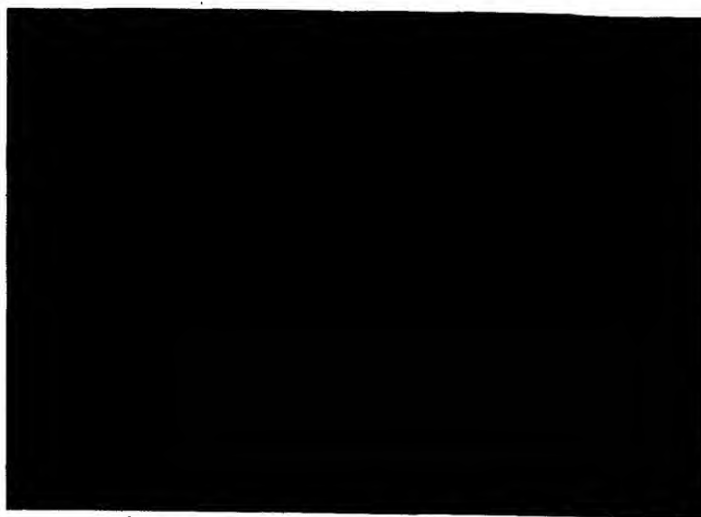
図 3



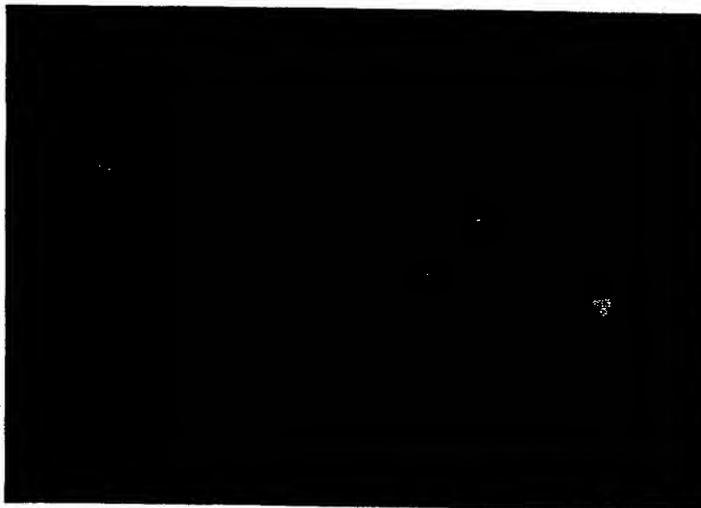
4/5

図 4

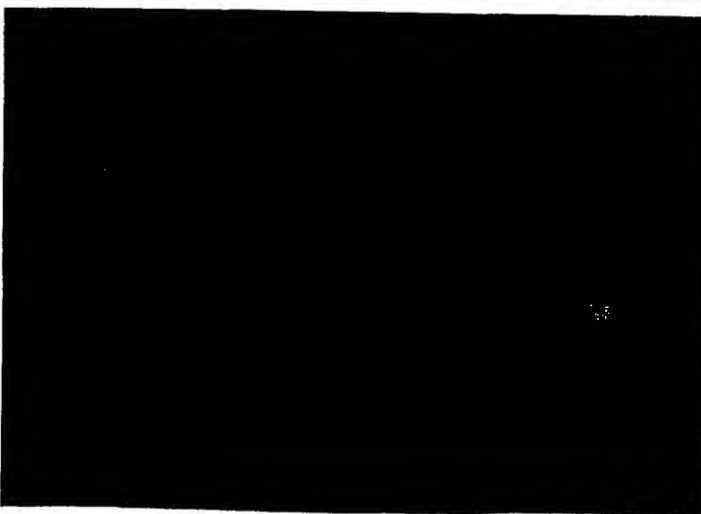
A



B



C



5

ECFP	CCTGACCTGGGGGT//ACTACATCAGCCA//ATATCACCGGGGAC//CAAGGCCAACTTC
type1	AC // T // CC // CC
type2	AC // A // CC // CC
type3	AC // A // TG // TG
type4	GG // A // CC // CC
EGFP	AC // A // TG // TG

1/3

SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

Japan Science and Technology Agency

<120> Conditional regulation of recombination between homologous DNA sequences

<130> RFH15-067;A132-14US(PCT)

<150> JP2002-376555

<151> 2002-12-26

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 29

<212> DNA

<213> Gallus gallus

<220>

<221> primer_bind

<222> (8)..(29)

<223>

<400> 1

gctgcagtgt ccttgggggt gaaattcag

29

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Gallus gallus

<220>

2/3

<221> primer_bind

<222> (9)..(30)

<223>

<400> 2

gctctagaac tgccccatt aaaaactttc

30

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Gallus gallus

<220>

<221> primer_bind

<222> (8)..(30)

<223>

<400> 3

gctctagaag gcacagcgct gtcagggtgc

30

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Gallus gallus

<400> 4

ccgcggccgc gtggtgggag cgggcagggg

30

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Escherichia coli

3/3

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(25)

<223>

<400> 5

ccatagaaga caccgggacc gatcc

25

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(24)

<223>

<400> 6

tgcacgctgc cgtcctcgat gttg

24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16496

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N15/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N15/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE/CA/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	Nickoloff, J.A., "Transcription Enhances Intra chromosomal Homologous Recombination in Mammalian Cells", Mol.Cell.Biol., (1992), Vol.12, No.12, pages 5311 to 5318; full text	<u>1</u> 2-11
Y	Buerstedde, J. and TAKEDA, S., "Increased Ratio of Targeted to Random Integration after Transfection of Chicken B. Cell Lines", Cell., (1991), Vol.67, No.1, pages 179 to 188; full text	2, 3, 5-7
Y	Chen, J. et al., "Mutations of the intronic IgH enhancer and its flanking sequences differentially affect accessibility of the JH locus", EMBO.J., (1993), Vol.12, No.12, pages 4635 to 4645; full text	4-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
26 March, 2004 (26.03.04)

Date of mailing of the international search report
13 April, 2004 (13.04.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16496

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Forrester, W.C., et al., "Dependence of Enhancer-Mediated Transcription of Immunoglobulin μ Gene on Nuclear Matrix Attachment Regions", Science, (1994), Vol.265, pages 1221 to 1225; full text	4-7
Y	Bachl, J. and Wabl, M., "Enhancers of hyper mutation", Immunogenetics, (1996), Vol.45, No.1, pages 59 to 64; full text	4-7,11
Y	Betz, A.G. et al., "Element Regulating Somatic Hypermutation of an Immunoglobulin κ Gene: Critical Role for the Intron Enhancer/Matrix Attachment Region", Cell, (1994), Vol.77, No.2, pages 239 to 248; full text	4-7,11
Y	Bachl, J. and Wabl, M., "An Immunoglobulin mutator targets G-C base pairs", Proc.Natl.Acad.Sci.USA, (1996), Vol.93, pages 851 to 855; full text	4-7,11
Y	Lahti, J.M., "Use of Gene Knockouts in Cultured Cells to Study Apoptosis", Methods, (1999), Vol.17, No.4, pages 305 to 312; full text	8
Y	Slebos, R. and Taylor, J.A., "A Novel Host Cell Reactivation Assay to Assess Homologous recombination Capacity in Human Cancer Cell Lines", Biochemical and Biophysical Research Communications, (2001), Vol.281, No.1, pages 212 to 219; full text	9,10
A	ARAKAWA, H. et al., "Requirement of the Activation-Induced Deaminase(AID) Gene for Immunoglobulin Gene Conversion", Science, (2002), Vol.295, pages 1301 to 1306; full text	4-7,11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16496

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claims of the present international application has the following 5 general inventive concept which are different from each other:
one having a special technical feature in "a cell (DT40) to be used in a method of inducing homologous recombination";
one having a special technical feature in "location of a promoter";
one having a special technical feature in "inserting an enhancer or a nuclear matrix-binding region";
one having a special technical feature in "a cell to which a method of inducing homologous recombination is applied"; and
one having a special technical feature in "a gene, (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
The parts relating to DT40 cell in claims 1 to 11.

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16496

Continuation of Box No. II of continuation of first sheet (1)

etc. subjected to the induction of homologous recombination".

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 C12N 15/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 C12N 15/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE/CA/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X - - - - Y	Nickoloff, J. A "Transcription Enhances Intrachromosomal Homologous Recombination in Mammalian Cells", Mol. Cell. Biol. (1992), Vol. 12, No. 12, pp. 5311-5318, 全文参照	1 - - - - 2-11
Y	Buerstedde, J and Takeda, S "Increased Ratio of Targeted to Random Integration after Transfection of Chicken B Cell Lines", Cell, (1991), Vol. 67, No. 1, pp. 179-188, 全文参照	2, 3, 5-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26.03.2004

国際調査報告の発送日

13.4.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新留 豊

4B

3334

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Chen, J et al. "Mutations of the intronic IgH enhancer and its flanking sequences differentially affect accessibility of the JH locus", EMBO J, (1993), Vol. 12, No. 12, pp. 4635-4645, 全文参照	4-7
Y	Forrester, W. C. et al. "Dependence of Enhancer-Mediated Transcription of Immunoglobulin μ Gene on Nuclear Matrix Attachment Regions", Science, (1994), Vol. 265, pp. 1221-1225, 全文参照	4-7
Y	Bachl, J and Wabl, M "Enhancers of hypermutation", Immunogenetics, (1996), Vol. 45, No. 1, pp. 59-64, 全文参照	4-7, 11
Y	Betz, A. G. et al. "Element Regulating Somatic Hypermutation of an Immunoglobulin κ Gene: Critical Role for the Intron Enhancer/Matrix Attachment Region", Cell, (1994), Vol. 77, No. 2, pp. 239-248, 全文参照	4-7, 11
Y	Bachl, J and Wabl, M "An Immunoglobulin mutator targets G·C base pairs", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1996), Vol. 93, pp. 851-855, 全文参照	4-7, 11
Y	Lahti, J. M "Use of Gene Knockouts in Cultured Cells to Study Apoptosis", Methods, (1999), Vol. 17, No. 4, pp. 305-312, 全文参照	8
Y	Slebos, R and Taylor, J. A. "A Novel Host Cell Reactivation Assay to Assess Homologous recombination Capacity in Human Cancer Cell Lines", Biochemical and Biophysical Research Communications, (2001), Vol. 281, No. 1, pp. 212-219, 全文参照	9, 10
A	Arakawa, H et al. "Requirement of the Activation-Induced Deaminase (AID) Gene for Immunoglobulin Gene Conversion", Science, (2002), Vol. 295, pp. 1301-1306, 全文参照	4-7, 11

第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法第 8 条第 3 項 (PCT 17 条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

この国際出願の請求の範囲は、
「相同組み換えの誘発方法に用いる細胞 (DT40)」に特別な技術的特徴を有するもの、
「プロモーターの配置」に特別な技術的特徴を有するもの、
「エンハンサー又は核マトリックス結合領域を挿入すること」に特別な技術的特徴を有するもの、
「相同組み換えの誘発方法が適用される細胞」に特別な技術的特徴を有するもの、
「相同組み換えが誘発される遺伝子等」に特別な技術的特徴を有するものという、
それぞれ異なる 5 つの一般的発明概念を含んでいる。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲 1-11 の内、DT40 細胞に関連する部分

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。